

研究论文

亲水性环氧聚合物磁性微球的制备及其 固定化青霉素酰化酶

薛 屏, 刘海峰, 杨金会

(宁夏大学能源化工自治区重点实验室, 宁夏 银川 750021)

摘要: 通过设计反相悬浮聚合体系, 制备了聚甲基丙烯酸缩水甘油酯 (GMA) - 甲基丙烯酸羟乙酯 (HEMA) - N, N' -亚甲基双丙烯酰胺 (MBAA) 亲水性磁性聚合物 GHM 微球。球中的 Fe_3O_4 微晶呈倒立尖晶石结构, 在微球表面存在着大量环氧基和亲水性的羟基及酰胺等基团, 这些功能性基团为青霉素酰化酶 (PGA) 的固定化提供了适宜的微环境; 同时, GHM 微球具有的大孔结构和较高的比表面积, 使其制备的固定化酶的载酶量高, 这些有利因素使得固定化酶 PGA/GHM 在 37℃ 下水解青霉素 G 钾合成 6-氨基青霉烷酸的表观活性达 748 IU · g⁻¹。PGA/GHM 经 15 次重复使用, 其催化活性未出现明显的衰减, 在使用中, 固定化酶在磁场的作用下能够快速沉降与产物分离。

关键词: 亲水性环氧聚合物; 磁性微球; 固定化青霉素酰化酶; 催化活性

中图分类号: TQ 028

文献标识码: A

文章编号: 0438-1157 (2008) 02-0443-07

Preparation of hydrophilic epoxy polymer magnetic beads and their immobilization for penicillin G acylase

XUE Ping, LIU Haifeng, YANG Jinhui

(Key Laboratory of Energy Resources & Chemical Engineering, Ningxia University, Yinchuan 750021, Ningxia, China)

Abstract: The hydrophilic epoxy polymer GHM magnetic beads, copolymerizing glycidyl methacrylate (GMA) - 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) - N, N' -methylene bisacrylamide (MBAA) in the presence of magnetic Fe_3O_4 powder, were prepared by designing a novel inverse suspension polymerization system, and were used as the support for immobilization of penicillin G acylase (PGA). The magnetic Fe_3O_4 in GHM beads had inversed cubic spinel structure and paramagnetic characteristics. A number of epoxy groups, hydrophilic hydroxyl and amido groups exist on the surface of the GHM beads and provide a micro-environment suitable for the immobilization of PGA, and the enzyme molecules can be immobilized covalently on the surface of GHM beads by the reaction between the amido groups of PGA and the active epoxy groups of the support. The GHM beads possessed a large pore size (mainly ranging from 15 nm to 55 nm) and a large specific surface area so that the immobilized enzyme (PGA/GHM) had high enzyme loading. As a result, the apparent activity of PGA/GHM reached 748 IU · g⁻¹ for hydrolyzing penicillin G potassium into 6-aminopenicillanic acid at 37°C, and its activity had not changed obviously after 15 recycles. The PGA loaded beads can settle quickly in the magnetic field and be separated easily from the product in applications.

Key words: hydrophilic epoxy polymer; magnetic beads; immobilized penicillin G acylase; catalytic activity

2007-04-04 收到初稿, 2007-07-25 收到修改稿。

联系人及第一作者: 薛屏 (1962-), 女, 博士, 教授。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (20564002); 国家重大基础研究前期研究专项 (2004CCA05900)。

Received date: 2007-04-04.

Corresponding author: Prof. XUE Ping. E-mail: ping@nxu.edu.cn

Foundation item: supported by the National Natural Science Foundation of China (20564002) and the State Key Program of Fundamental Research (2004CCA05900).

引 言

现代基因工程技术实现了生物酶的大批量生产,生物酶催化剂已被越来越广泛地应用于精细化学品、药物和食品的生产过程。然而,可溶性酶直接用于催化过程,酶与产物不但难以分离且不可重复使用,造成使用成本居高。因此,酶的固定化技术是酶生物催化剂应用领域研究的重要课题。青霉素酰化酶(PGA)在半合成抗生素产业中发挥着十分重要的作用,它既能够催化水解青霉素G生成6-氨基青霉烷酸,又能够催化合成各种不同的半合成青霉素^[1]。目前,用于PGA固定化研究和应用最多的载体包括无机介孔材料和有机高分子材料。MCM-48和SBA-15等介孔分子筛对青霉素酰化酶有较强的吸附能力和吸附容量,制备的固定化酶具有较高的催化活性,但是操作稳定性很低,其原因是酶分子与载体的结合力(物理吸附作用)较弱,在使用过程中酶发生了脱落^[2-3]。分子筛表面进行有机基团功能化后在一定程度上可以改善固定化酶的操作稳定性^[4],但功能化过程复杂,成本高。合成高分子具有易成型和结合酶量高的优点^[5],在材料的设计上通过选择合适的聚合单体,能够使与酶分子产生共价键作用的有机功能性基团直接在材料上形成,这在很大程度上简化了酶固定化的操作过程,因而易于实现工业化应用。

磁性聚合物微球制备的固定化酶,既适用于分批间歇操作工艺又适用于连续操作工艺,既可用于固定化床也可用于流化床,其突出的优势是在磁场作用下能够有效快速地与反应介质分离。青霉素酰化酶的分子量较大,其由2个亚基组成,即分子量为19500的含有侧链结合点的亚基和分子量为6000的含有催化位点的亚基,体积较大的PGA分子在与载体结合的过程中,空间位阻和扩散效应均十分突出^[1]。青霉素酰化酶属于亲水性的生物酶,其高级结构对载体材料所提供的微环境十分敏感,适宜的固定化环境将使得固定化酶具有高的催化活性。载体颗粒细小,其比表面积、官能团密度和选择性吸附能力增大,载体结合酶量高,酶催化反应过程的传质速度快,固定化酶催化效率高。然而,固定化酶颗粒越细,自由沉降的速度越慢,造成与产物分离困难,经过多次与产物进行分离及洗涤后,催化剂的损失十分严重。利用磁性聚合物微球作载体,固定化酶在磁场力的作用下可以快速有效

地与产物分离,从而可防止固定化酶在分离及洗涤过程中流失,十分适合于工业化生产^[6]。王卫等^[7]利用悬浮聚合法合成了甲基丙烯酸羟乙酯-苯乙烯-二苯乙烯磁性高分子微球,再用功能化试剂环氧氯丙烷与微球的羟基反应进行活化,载体活化后制备的固定化PGA的活性得到大幅度提高。

本文将通过设计反相悬浮聚合新体系,在 Fe_3O_4 磁流体存在下,制备亲水性环氧聚合物磁性微球,并研究其结构性质和对青霉素酰化酶的固定化作用。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与仪器

青霉素酰化酶(PGA, $478 \text{ IU} \cdot \text{ml}^{-1}$, 浙江顺风海德尔公司),青霉素G钾(河北制药厂),甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA, 上海润捷化学试剂有限公司,减压蒸馏后使用),甲基丙烯酸羟乙酯(HEMA, AR, ACROS), N, N' -亚甲基双丙烯酰胺(MBAA, AR, 天津科密欧化学试剂开发中心),偶氮二异丁腈(AIBN, AR, 天津科密欧化学试剂开发中心,乙醇提纯后使用),其他试剂均为分析纯。

磁性微球形貌观察采用日本JEOL JSM-6360LV扫描电子显微镜;磁性能由美国Lake Shore 7304振动样品磁强计(VSM)测定,磁场强度范围 $-1.6 \times 10^6 \sim 1.6 \times 10^6 \text{ A} \cdot \text{m}^{-1}$;物相分析采用日本理学K/MaX-3c X射线衍射仪,Cu靶 K_α 射线,管压40 kV,管流40 mA;FT-IR分析采用德国Bruker Tensor 27红外光谱仪,KBr压片。比表面积、平均孔径和孔容的测定采用美国MICROMERITCS ASAP2010物理吸附仪, N_2 吸附质,测定前样品在 50°C 真空脱气10 h。

1.2 实验方法

1.2.1 Fe_3O_4 磁流体的制备 将2.0 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 和5.4 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶于200 ml去离子水中,加热至 60°C 搅拌下滴入浓氨水至pH值为9。悬浮液在 60°C 下熟化30 min后进行过滤分离,固体用去离子水洗至中性后在 60°C 下烘干,得到 Fe_3O_4 磁粉。称取一定质量的 Fe_3O_4 磁粉与甲酰胺混合(Fe_3O_4 与甲酰胺的质量比为1:32),在 60°C 搅拌下充分进行分散,制成 Fe_3O_4 磁流体。

1.2.2 磁性聚合物微球的制备 在装有恒速搅拌机、氮气管和冷凝管的四口瓶中加入一定体积的正

庚烷, 用四氯乙烯调节其密度至 $1.1 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$, 以此混合有机溶剂作悬浮介质。悬浮介质在 60°C 水浴中加热, 然后加入硬脂酸钙和 Span60。将一定配比的 GMA、HEMA 和 MBAA 单体加入上述制备的 Fe_3O_4 磁流体中, 搅拌 30 min 后转移至预热的悬浮介质中。控制搅拌机转速为 $500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 待含有 Fe_3O_4 的单体相分散成均匀的小液滴时(可吸取少量用光学显微镜进行观察), 加入 1.0 g AIBN 引发剂, 在氮气保护下反应 5 h。停止反应后, 磁场作用下分离出聚合物微球, 并用丙酮洗涤。经丙酮浸泡 7 d 后, 分离出的微球在室温下进行真空干燥。

1.2.3 微球中 Fe_3O_4 和环氧基团含量的测定 微球中 Fe_3O_4 的质量分数采用分光光度法测定, 使用 MILTON ROY COMPANY SEPCTRONIC 21 分光光度计, 邻二氮菲为显色剂, 波长 $\lambda = 510 \text{ nm}$ 。微球先经 600°C 灼烧 4 h, 其中的 Fe_3O_4 用 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶解后进行分析。微球中环氧基团含量的测定方法详见文献 [8], 其环氧基团含量用 W_e ($\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$) 表示。

1.2.4 固定化酶的制备及其载酶量和表观活性的测定 称取 0.100 g GHM 磁性微球(粒径 $0.11 \sim 0.18 \text{ mm}$), 用去离子水溶胀, 吸去水后, 加入 0.4 ml PGA 原液和 2.0 ml pH 7.8 的磷酸盐缓冲溶液, 置于 30°C 水浴摇床中反应 72 h。

固定化酶表观活性的测定采用碱滴定法^[2]。在磁场作用下分离和洗涤固定化酶微球, 收集滤液和洗涤液。固定化酶装入间歇式微反应器, 加入 8.0 ml 去离子水和 2.0 ml $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.8 的磷酸盐缓冲溶液, 将 37°C 预热的青霉素 G 钾水溶液(质量分数 8%) 移至反应器中, 通过滴入 NaOH 标准溶液中和生成的苯乙酸控制反应液的 pH 值为 7.8。固定化酶平行测定 3 个样, 记录每次反应进行 3 min 所消耗的 NaOH 溶液的体积, NaOH 溶液的体积取 3 次测定的平均值。固定化酶的表观活性 A ($\text{IU} \cdot \text{g}^{-1}$) 由下式计算

$$A = c_{\text{NaOH}} V_{\text{NaOH}} \times 1000 / mt$$

式中 V_{NaOH} 为消耗 NaOH 溶液的体积, ml; c_{NaOH} 为 NaOH 溶液的浓度, $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; m 为载体质量, g; t 为反应时间, min。

用 Bradford 方法^[9]测定固定化时加入的酶蛋白质量和未固定的酶蛋白质量(即滤液和洗涤液中的酶量), 固定化酶的活力回收率 RRA (%) 和载

酶量 E_n ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 计算如下

$$\text{RRA} = \frac{\text{首次测定固定化酶活力}}{\text{加入的原酶液总活力} - \text{上清液残余酶活力}} \times 100\%$$

$$E_n = \frac{\text{加入的酶质量} - \text{未固定的酶质量}}{\text{载体质量(干重)}}$$

1.2.5 操作稳定性测定 采用间歇操作方式考察固定化酶的操作稳定性, 每次反应的底物均为 0.400 g 。反应后, 固定化酶用磷酸盐缓冲溶液洗涤后, 再次装入反应器, 重复使用 15 次, 具体操作步骤见文献 [5]。

2 结果与讨论

2.1 GHM 微球的结构性能表征

2.1.1 XRD、SEM 和 VSM 分析 图 1 为 GHM 磁性微球和 Fe_3O_4 磁粉的 XRD 谱图。由图 1 曲线 b 可知, 制备的 Fe_3O_4 具有倒立尖晶石结构, 2θ 在 35.8° 、 62.8° 和 30.2° 的衍射峰分别为立方 Fe_3O_4 的特征衍射峰(三强峰), 依次对应于 (311)、(440) 和 (220) 晶面。在 GHM 微球的 XRD 谱图(图 1 曲线 a) 中, Fe_3O_4 的 (311)、(440) 和 (220) 特征衍射峰依然存在, 且各衍射峰的 2θ 值与 Fe_3O_4 相应衍射峰的 2θ 值完全一致, 说明存在于 GHM 微球中的 Fe_3O_4 微粒保持着其原有的晶格结构。在 GHM 微球的 XRD 图中, 2θ 在 $15^\circ \sim 30^\circ$ 范围出现了宽化的衍射峰, 这是非晶态聚合物的衍射峰, 说明在 GHM 中高分子基本上是以无定形体存在的。

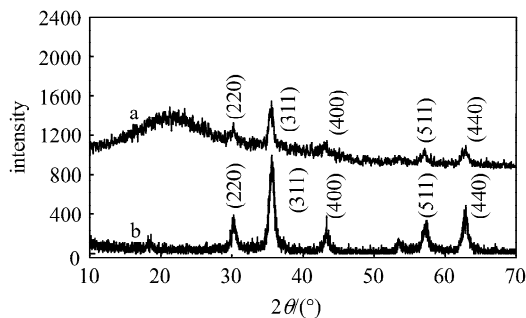


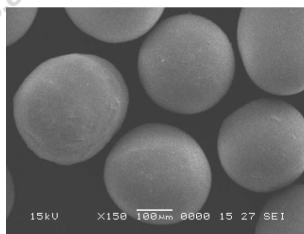
图 1 GHM 微球 (a) 和 Fe_3O_4 磁粉 (b) 的 XRD 谱图

Fig. 1 XRD patterns of GHM beads (a) and

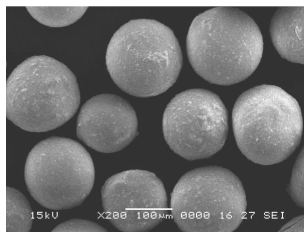
Fe_3O_4 powder (b)

GHM: $m_{\text{GMA}} : m_{\text{HEMA}} = 2 : 1$, 60% MBAA, 13.7% Fe_3O_4

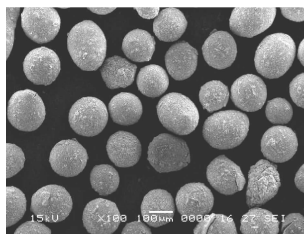
由图 2 可知, 由设计的反相悬浮聚合体系制备的 GHM 聚合物呈球形, 球体之间不粘连。在 Fe_3O_4 含量较低时 (8.4%), 小球表面比较光滑 [图 2 (a)]; 当 Fe_3O_4 含量由 8.4% 增至 13.7% 和



(a) 8.4 %



(b) 13.7 %



(c) 15.1 %

图 2 不同 Fe₃O₄ 含量 GHM 微球的 SEM 照片

Fig. 2 SEM images of GHM beads with different Fe₃O₄ contents

(GHM: $m_{\text{GMA}} : m_{\text{HEMA}} = 2 : 1$, 60% MBAA)

15.1%，仍未出现粘球现象，只是随着 Fe₃O₄ 含量的增加，球体表面变得有些粗糙 [图 2 (b)、(c)]，在 Fe₃O₄ 含量为 15.1% 时，有一部分微球出现变形，大致呈椭圆形。

球形无机-有机高分子磁性复合材料的制备，关键问题在于如何使无机磁性物质和有机单体间有较好的亲和作用。研究表明，用油酸和十二烷基苯磺酸钠表面活性剂对 Fe₃O₄ 磁粉表面进行改性，经乳液聚合可以制得聚苯乙烯-甲基丙烯酸磁性高分子微球^[10]。Fe₃O₄ 磁粉表面具有一定的亲水性，但与 *N,N'*-亚甲基双丙烯酰胺和甲基丙烯酸羟乙酯以及甲基丙烯酸缩水甘油酯组成的单体相的亲和作用仍很低，结果在聚合过程中，Fe₃O₄ 微粒不能被有效、均匀地分布于聚合物网络微格中。研究中发现，用极性溶剂甲酰胺分散 Fe₃O₄ 形成均匀的磁流体，能够有效地提高 Fe₃O₄ 微粒表面的亲水性，明显地改善了 Fe₃O₄ 与单体间的亲和作用，这样利用反相悬浮聚合技术能够合成亲水性环氧聚

合物 GHM 磁性微球。

GHM 微球的磁滞回线均为“S”形 (图 3)，且曲线关于原点对称，当外加磁场 $H = 0$ 时，GHM 聚合物磁性微球没有剩磁存在 ($M = 0$)，表明合成的 GHM 微球呈现出铁磁性材料的超顺磁特性。随着微球中 Fe₃O₄ 含量增加，GHM 微球的饱和和磁化强度增大。当 Fe₃O₄ 含量为 4.0% 时，微球的饱和和磁化强度为 $2.9 \text{ emu} \cdot \text{g}^{-1}$ ，其磁响应性较弱；当 Fe₃O₄ 含量增至 15.1% 时，微球的饱和磁化强度达 $8.3 \text{ emu} \cdot \text{g}^{-1}$ ，在磁场强度为 $4200 \times 10^{-4} \text{ T}$ 的磁场中，相同粒径大小的 GHM 微球制备固定化酶，PGA/GHM (约 15% Fe₃O₄) 的沉降速度大约是 PGA/GHM (约 4% Fe₃O₄) 的 3.3 倍。GHM 微球用作生物酶固定化的载体，其超顺磁性使得固定化酶易于与产物快速分离，防止固定化酶在使用中出现流失。

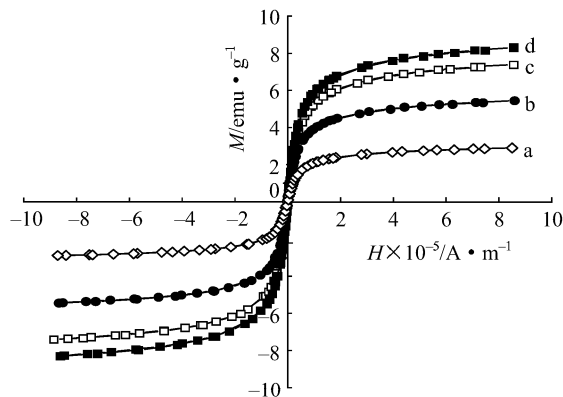


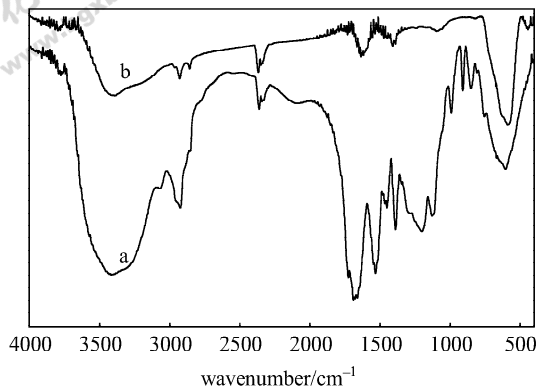
图 3 不同 Fe₃O₄ 含量 GHM 微球的磁化曲线

Fig. 3 Magnetization curves of GHM beads with different Fe₃O₄ contents

(GHM: $m_{\text{GMA}} : m_{\text{HEMA}} = 2 : 1$, 60% MBAA)

a—4.1%；b—8.4%；c—13.7%；d—15.1%

2.1.2 FT-IR 分析和孔径分布测定 图 4 为 GHM 微球和 Fe₃O₄ 磁粉的 FT-IR 谱图。在图 4 曲线 a 中，位于 901、843 和 801 cm^{-1} 的吸收峰归属为环氧基团红外振动 3 个特征吸收峰；在 3300 cm^{-1} 处强吸收带是羟基振动吸收峰；而在约 1720 cm^{-1} 的强吸收峰是酰胺基团 ($-\text{CONH}_2$) 的振动吸收峰，说明 GHM 微球中有大量的环氧基、羟基和酰胺基基团存在。与 Fe₃O₄ 磁粉的 FT-IR 谱图 (图 4 曲线 b) 比较，在图 4 曲线 a 中存在着 Fe₃O₄ 磁粉的特征吸收峰 (约 585 cm^{-1})，说明 Fe₃O₄ 磁粉包埋在聚合物交联的网络格中，而聚合过程对 Fe₃O₄ 微粒的晶格结构没有产生影响。

图4 GHM微球(a)和Fe₃O₄磁粉(b)的FT-IR谱图Fig. 4 FT-IR spectra of GHM beads (a) and Fe₃O₄ powder (b)(GHM: $m_{\text{GMA}} : m_{\text{HEMA}} = 2 : 1$, 60% MBAA, 13.7% Fe₃O₄)

由孔径分布测定结果可知, GHM磁性微球具有大孔结构, 其孔径分布较宽(几纳米至近百纳米), 主要集中在15~55 nm。控制配料比 $m_{\text{GMA}} : m_{\text{HEMA}} = 2 : 1$, 交联剂 MBAA 为单体总量的60%, Fe₃O₄ 含量为13.7%时, GHM微球的平均孔容和最可几孔径分别为 $0.58 \text{ m}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ 和 31.4 nm, 其比表面积为 $119.2 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ 。实验得出, 当单体配料比一定时, 在实验范围内合成的GHM微球的比表面积、平均孔径和孔体积变化不大(见表1)。

2.2 酶固定化结果

交联剂 MBAA 用量 $\geq 60\%$ 时, 合成的GHM磁性微球机械强度较好。控制 MBAA 用量为60%, 调节 Fe₃O₄ 含量和原料 GMA 与 HEMA 的配比, 以合成的GHM微球制备固定化酶 PGA/GHM, 其水解青霉素 G 钾制备 6-APA 的表观活

性列于表1。

由表1数据可知, 当 Fe₃O₄ 含量接近时, 固定化酶的表观活性与合成GHM微球时单体 GMA 与 HEMA 的配比有关。 $m_{\text{GMA}} : m_{\text{HEMA}}$ 值为 2 : 1 时制备的GHM微球得到的固定化酶的表观活性高于比值为 1 : 1 和 4 : 1 的GHM制备的固定化酶。由于酶分子是通过与微球表面上活性环氧基团的共价键合而固定, 因而微球表面环氧基团的数量影响着固定化酶的载酶量。当原料中 $m_{\text{GMA}} : m_{\text{HEMA}}$ 值较低时(如 1 : 1), 含有微球中环氧基团的 GMA 单体的用量相对较低, GHM 表面环氧基团数量较少, 固定化酶的载酶量和表观活性偏低, 而活力回收率较高。当 $m_{\text{GMA}} : m_{\text{HEMA}}$ 值为 2 : 1 时, 固定化酶载酶量增多, 其表观活性有显著的提高, 在 Fe₃O₄ 含量为 8% 左右, 固定化酶的表观活性为 $748 \text{ IU} \cdot \text{g}^{-1}$ 。 $m_{\text{GMA}} : m_{\text{HEMA}}$ 值增至 4 : 1 时, 固定化酶的载酶量仍有所增大, 但固定化酶的表观活性和活力回收却有所下降, 这可能是由于过量键合的酶分子占据了大量的内孔空间, 阻碍了酶分子与底物的有效接触及产物的扩散; 另外环氧基团数量多, 酶被多点固定的机会增大, 导致酶分子起催化作用的亚基空间构型改变, 活性下降^[11]。

从表1可知, 磁性微球中 Fe₃O₄ 的含量对 PGA/GHM 的表观活性影响显著, 总的规律是单体配比相同时, Fe₃O₄ 含量较高时, PGA/GHM 的表观活性较低。微球中 Fe₃O₄ 含量较多时, 其磁响应性强(如图3), 但其中聚合物的比例较低, 微球的密度增大, 这样单位质量微球的表面环氧基团的数量则减少, 导致固定化酶的载酶量和活性降

表1 GHM微球的结构性质和固定化PGA的表观活性

Table 1 Structural properties of GHM beads and apparent activity of immobilized PGA

GHM ^① ($m_{\text{GMA}} : m_{\text{HEMA}}$)	V / $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$	D /nm	S _{BET} / m^2	Fe ₃ O ₄ /%	W _e / $\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$	E _n / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	A / $\text{IU} \cdot \text{g}^{-1}$	RRA /%
1 : 1	0.64	29.7	114.5	4.0	0.51	37.0	610	36.5
1 : 1	0.60	30.0	110.8	8.0	0.41	33.5	577	38.1
1 : 1	0.67	31.1	111.6	13.0	0.32	31.2	541	38.4
1 : 1	0.62	32.0	110.4	15.7	0.29	30.3	427	31.2
2 : 1	0.60	28.6	120.0	4.1	0.70	64.7	780	26.7
2 : 1	0.58	31.4	119.2	8.4	0.58	63.6	748	26.0
2 : 1	0.59	29.3	104.5	13.7	0.46	55.3	700	28.0
2 : 1	0.61	30.6	106.7	15.1	0.36	34.7	523	33.4
4 : 1	0.58	29.0	113.8	4.1	0.82	67.0	732	24.2
4 : 1	0.63	30.3	107.2	8.3	0.73	66.0	718	24.1
4 : 1	0.56	30.9	109.5	13.3	0.48	58.5	683	25.8
4 : 1	0.61	29.3	106.8	15.8	0.40	41.0	498	26.9

① 60% MBAA.

低。由此可见, Fe_3O_4 含量不宜过高, 在 Fe_3O_4 含量为 8% 左右, PGA/GHM 固定化酶在磁场中能够快速沉降, 与产物分离和洗涤的时间明显缩短。继续提高 Fe_3O_4 含量, 固定化酶在磁场中的沉降速度进一步加快。值得说明的是, 磁粉 Fe_3O_4 几乎无孔, 在其表面可以吸附少量的酶 (载酶量约 $3 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), 但洗涤过程中这部分酶分子多数脱落。在 GHM 微球中, Fe_3O_4 微粒主要包裹于聚合物的网络结构中, 其接触 PGA 酶分子的机会远小于表层的聚合物, 这样 GHM 微球对 PGA 的固定化作用主要是亲水性含活性环氧基团的聚合物。

2.3 PGA/GHM 的操作稳定性

固定化酶 PGA/GHM 用于催化水解定量的青霉素 G 钾, 反应结束后, 在磁场中分离洗涤后循环使用。记录每次水解反应所进行的时间 (min) 和反应所消耗 NaOH 溶液的体积 (ml), 结果见图 5。

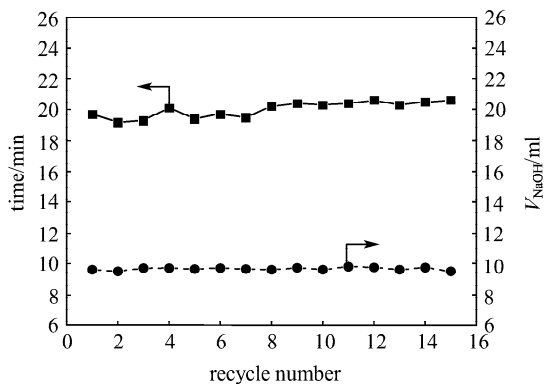


图 5 GHM 微球固定化 PGA 的操作稳定性

Fig. 5 Operational stability of PGA immobilized on GHM beads

(GHM: $m_{\text{GMA}} : m_{\text{HEMA}} = 2 : 1$, 60% MBAA, 13.7% Fe_3O_4)

从理论可计算出, 完全中和底物水解产生的苯乙酸所需要的标准 NaOH 溶液为 10.74 ml。由图 5 可以看到, 15 批间歇操作所消耗的标准 NaOH 溶液为 9.50~9.80 ml, 推算出每批反应中 6-APA 的收率均在 88% 以上, 此值接近于文献值^[12]。在进行第 15 次反应时, 水解反应所需的时间为 20.6 min, 与首次水解反应时间 19.7 min 相比, 略有延长, 但变化幅度很小, 这表明经 15 次间歇操作使用, 固定化酶的表现活性没有发生大的衰减。从定量水解青霉素 G 钾所需的反应时间进行推算, 经 15 次使用, 其表现活性约保持固定化酶初始活性的 95%, 固定化酶的半衰期为 993 批。

3 结 论

合成的亲水性聚合物 GHM 磁性微球表面存在着大量的环氧基、羟基和酰胺基等有机基团, 这些功能性基团为青霉素酰化酶的固定化提供了适宜的微环境, 其大孔结构和高的比表面积, 为体积较大的酶分子与存在孔内环氧基的共价结合以及底物分子与固定化酶的接触提供了更多的机会, 这些有利因素使得 GHM 微球制备的固定化青霉素酰化酶具有高的催化活性 ($748 \text{ IU} \cdot \text{g}^{-1}$)。GHM 微球借助自身的活性环氧基团不仅在无需预活化下一步实现酶分子的固定化, 且酶与载体结合牢固, PGA/GHM 具有良好的操作稳定性, 而在磁场中固定化酶能够快速与产物分离, 不出现流失, 因而具有一定的工业化应用前景。

References

- [1] Kallenberg A I, Rantwijk F, Sheldon R A. Immobilization of penicillin G acylase: the key to optimum performance. *Adv. Synth. Catal.*, 2005, **347**: 905-926
- [2] Xue P, Lu G Z, Guo Y L, Wang Y S, Guo Y. A novel support of MCM-48 molecular sieve for immobilization of penicillin G acylase. *J. Mol. Catal., B: Enzym.*, 2004, **30**: 75-81
- [3] Maria A S, Zhao X S. Design of large-pore mesoporous material for immobilization of penicillin G acylase biocatalyst. *Catal. Today*, 2004, **93/94/95**: 293-299
- [4] Gao Bo (高波), Zhu Guangshan (朱广山), Fu Xueqi (付学奇), Teng Lirong (滕利荣), Chen Jing (陈静), Wang Chunyan (王春艳), Qiu Shilun (裘世纶). Modification of mesoporous material and stability of immobilization of penicillin G acylase. *Chemical Journal of Chinese Universities* (高等学校化学学报), 2006, **27** (10): 1823-1826
- [5] Xue P, Lu G Z, Liu W Y. Poly (GMA/MA/MBAA) copolymer beads: a highly efficient support immobilizing penicillin G acylase. *Chin. Chem. Lett.*, 2006, **17**: 129-132
- [6] Guan Yueping (官月平), Jiang Bo (姜波), Zhu Xinghua (朱星华), Liu Huizhou (刘会洲). Recent developments of magnetic separation in biotechnology (I): Preparation of magnetic carriers and surface chemical modification. *Journal of Chemical Industry and Engineering (China)* (化工学报), 2000, **51** (suppl.): 315-319
- [7] Wang Wei (王卫), Zeng Lixi (曾力希), Liu Linlin (刘琳琳), Deng Le (邓乐). Preparation and application of

- epoxidized hydroxyl magnetic microspheres for immobilization of penicillin G acylase. *Chinese Journal of Pharmaceuticals* (中国医药工业杂志), 2005, **37**: 398-401
- [8] Sundberg L, Porath J. Preparation of adsorbents for biospecific affinity chromatography. *J. Chromatogr.*, 1974, **90**: 87-98
- [9] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, **72**: 248-256
- [10] An Lijuan (安丽娟), Li Zhaoqiang (李兆强), Xu Wei (徐妮), Chen Xinfang (陈欣芳), Yang Bai (杨柏). Preparation and characterization of superparamagnetic polymer microspheres. *Chemical Journal of Chinese Universities* (高等学校化学学报), 2005, **26**: 366-369
- [11] Torres R, Mateo C, Fernández-Lorente G, Ortiz C, Fuentes M, Palomo J M, Guisan J M, Fernández-Lafuente R. A novel heterofunctional epoxy-amino sephabeads for a new enzyme immobilization protocol: immobilization-stabilization of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Biotechnol. Prog.*, 2003, **19**: 1056-1060
- [12] Han Hui (韩辉), Xu Guanzhu (徐冠珠). Studies on the immobilized penicillin acylase on polymer beads. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), 2001, **41**: 204-208